(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0073633
(43) 공개일자 2024년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7004 (2006.01) *A61K 31/221* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7004 (2013.01)
A61K 31/221 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0155706
(22) 출원일자 2022년11월18일
심사청구일자 2022년11월18일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)
고려대학교 세종산학협력단
세종특별자치시 조치원읍 세종로 2511 (고려대학교세종캠퍼스내)
(72) 발명자
박준태
인천광역시 연수구 해송로 143, 101동 703호
국명옥
인천광역시 계양구 임학서로42번길 3, 401호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
차준용

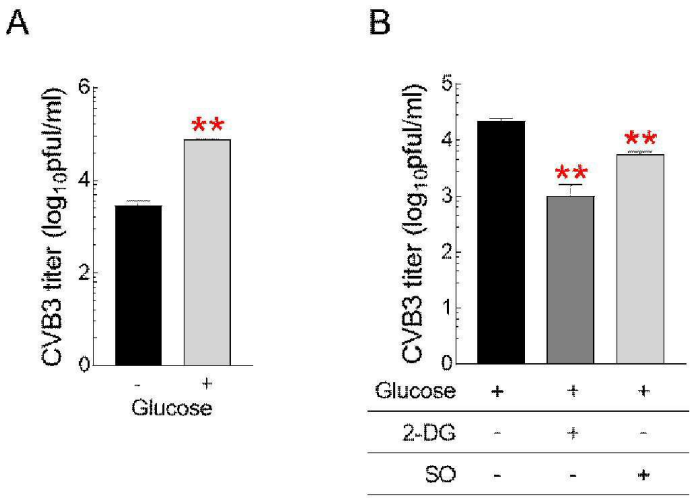
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **콕사키바이러스 B3 감염 치료 또는 예방용 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 일실시예는 당분해과정(glycolysis) 억제제를 포함하는 콕사키바이러스(Coxsackievirus) B3의 감염 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다. 콕사키바이러스 B3의 감염은 숙주세포의 에너지 대사과정을 변화시키는데, 특히 당분해수준을 증가시킴으로써 대사과정에 변화를 야기시킬 수 있다. 따라서, 당분해과정 억제제인 2-디옥시-D-글루코스(2-Deoxy-d-glucose) 또는 옥살산나트륨(Sodium oxamate)이 콕사키바이러스 B3의 증식 억제에 효과적일 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61P 31/14 (2018.01)

(72) 발명자
박지윤
인천광역시 연수구 아카데미로 119, 제 1 기숙사 B동 911호
권형욱
서울특별시 서초구 효령로4길 56-16, 201호
변영주
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 206동 408호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711167754
과제번호	2021R1A2C1004298
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구지원사업
연구과제명	미토콘드리아 대사 기반 통합적 노화 제어
기 여 율	0.35/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415180937
과제번호	20019181
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	산업기술알키미스트프로젝트
연구과제명	세포 에너지 대사 조절을 통한 노화 제어
기 여 율	0.35/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2029.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345351426
과제번호	2020R1A6A1A03041954
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	대학중점연구소지원사업
연구과제명	융복합기반기술을 이용한 감염병 매개곤충 제어 플랫폼 구축
기 여 율	0.2/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2020.05.01 ~ 2023.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345347104
과제번호	2019R1A6A1A03031807
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	대학중점연구소지원사업
연구과제명	표적검증 통합플랫폼(i-TV) 기반 면역시스템 제어 혁신의약 개발 연구
기 여 율	0.1/1
과제수행기관명	고려대학교 세종산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2025.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

당분해과정(glycolysis) 억제제를 유효성분으로 포함하는 콕사키바이러스 B3 감염 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 당분해과정 억제제는 2-디옥시-D-글루코스(2-Deoxy-d-glucose) 또는 옥살산나트륨(Sodium oxamate)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 콕사키바이러스 B3는 숙주세포의 당분해과정 수준을 증폭시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 당분해과정 수준은 당분해과정, 당분해 능력(glycolytic capacity) 또는 당분해 비축(glycolytic reserve)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 콕사키바이러스 B3는 숙주세포의 미토콘드리아 막전위를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 콕사키바이러스 B3의 감염은 숙주세포 내 2종 이상의 대사산물(metabolites)과 음의 상관관계를 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 대사산물은 1종 이상의 아미노산 및 1종 이상의 유기산인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 아미노산은 프롤린(proline), 알라닌(alanine), 글리신(glycine), 베타 알라닌(β-alanine), 아스파르트산(aspartic acid) 및 글루탐산(glutamic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 유기산은 인산(phosphoric acid), 말산(malic acid) 및 푸마르산(fumaric acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 콕사키바이러스 B3의 감염은 숙주세포 내 5종 이상의 대사산물(metabolites)과 양의 상관관계를 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 대사산물은 1종 이상의 아미노산, 1종 이상의 유기산, 1종 이상의 당, 1종의 아민 및 1종의 당알코올인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 아미노산은 글루타민(glutamine), 세린(serine), 류신(leucine), 페닐알라닌(phenylalanine), 트레오닌(threonine), 발린(valine) 및 이소류신(isoleucine)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 유기산은 젖산(lactic acid), 숙신산(succinic acid) 및 구연산(citric acid) 으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 당은 과당(fructose) 및 글루코스(glucose)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 아민은 에탄올아민(ethanolamine)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

제11항에 있어서,

상기 당알코올은 글리세롤(glycerol)인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 콕사키바이러스 B3의 감염 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 당 분해과정 억제제를 포함하는 콕사키바이러스 B3의 감염 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 현대에 이르러 인플루엔자 바이러스, 수포성 구내염, 중증호흡기질환바이러스(SARS), 식중독 유발 노로바이러스, 특히 코로나 바이러스 등의 바이러스 창궐이 전세계적인 문제로 심화되고 있다.

[0004] 콕사키바이러스(Coxsackievirus)는 외피지질을 갖지 않는 RNA 바이러스(non-enveloped RNA virus)로서, 단일가닥의 양성센스(single-stranded positive sense)의 RNA 게놈(약 7.4kb)을 가지고 있다. 이러한 콕사키바이러스는 피코르나바이러스(Picornaviridae) 패밀리에 속하며, 또한 폴리오바이러스(Poliovirus)와 함께 엔테로바이러스(Enterovirus) 속에 속한다. 콕사키바이러스는 장내 바이러스의 일종으로 심근염, 수족구, 췌장염과 같은 다양한 질병을 일으킨다. 특히, 이러한 콕사키바이러스 중 B그룹에 속하는 콕사이바이러스 B3(CVB3)는 심근염과 같은 염증질환을 일으키는 요인으로 보고되고 있다.

[0005] 이러한 바이러스는 효소를 사용하여 유전자를 복제하고 막단백질과의 조립과정을 통해 바이러스를 증식하게 된다. 증식된 바이러스는 성숙과정을 통해 활성을 갖게 되어 세포를 죽이고 세포 밖으로 나와 2차 감염을 시도하게 된다. 따라서, 이러한 바이러스의 증식과 활동의 모든 과정이 바이러스 증식억제를 위한 항바이러스 치료제의 모든 표적이 될 수 있으나 여태까지 최종 승인되어 시장에 나온 치료제는 없었다.

[0006] 이에, 해당 기술분야에서는 콕사이키바이러스 B3(CVB3)에 대한 치료제 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 효과적인 콕사이키바이러스 B3의 감염 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일실시예는 당분해과정(glycolysis) 억제제를 포함하는, 콕사키바이러스 B3의 감염 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 당분해과정 억제제는 2-디옥시-D-글루코스(2-Deoxy-d-glucose) 또는 옥살산나트륨(Sodium oxamate)일 수 있다.

[0013] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 콕사키바이러스 B3는 숙주세포의 당분해과정 수준을 증폭시킬 수 있다.

[0014] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 당분해과정 수준은 당분해과정, 당분해 능력(glycolytic capacity) 또는 당분해 비축(glycolytic reserve)일 수 있다.

[0015] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 콕사키바이러스 B3는 숙주세포의 미토콘드리아 막전위를 감소시킬 수 있다.

[0016] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 콕사키바이러스 B3의 감염은 숙주세포 내 2종 이상의 대사산물(metabolites)과 음의 상관관계를 가질 수 있다.

[0017] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 대사산물은 1종 이상의 아미노산 및 1종 이상의 유기산일 수 있다.

[0018] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 아미노산은 프롤린(proline), 알라닌(alanine), 글리신(glycine), 베타 알라닌(β-alanine), 아스파르트산(aspartic acid) 및 글루탐산(glutamic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0019] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 유기산은 인산(phosphoric acid), 말산(malic acid) 및 푸마르산(fumaric acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0020] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 콕사키바이러스 B3의 감염은 숙주세포 내 5종 이상의 대사산물(metabolites)과 양의 상관관계를 가질 수 있다.

[0021] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 대사산물은 1종 이상의 아미노산, 1종 이상의 유기산, 1종 이상의 당, 1종의 아민 및 1종의 당알코올일 수 있다.

[0022] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 아미노산은 글루타민(glutamine), 세린(serine), 류신(leucine), 페닐알라닌(phenylalanine), 트레오닌(threonine), 발린(valine) 및 이소류신(isoleucine)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0023] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 유기산은 젖산(lactic acid), 숙신산(succinic acid) 및 구연산(citric acid) 으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0024] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 당은 과당(fructose) 및 글루코스(glucose)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0025] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 아민은 에탄올아민(ethanolamine)일 수 있다.

[0026] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 당알코올은 글리세롤(glycerol)일 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 실시예에 따른 조성물은 콕사이키바이러스 B3의 증식을 효과적이면서 안전하게 예방 또는 억제할 수 있다.

[0029] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 CVB3가 당분해과정 증가를 통해 대사적 변화를 야기시키는 것을 보여주는 그래프이고, 구체적으로, (A)는 헬라 세포(Hela cells)는 CVB3에 12시간 또는 24시간동안 감염되었고, CVB3 역가를 정량화하기 위해 플라크 분석을 실시한 그래프이다. Means ± S.D., N = 3. (B)는 ECAR(검은 선: 감염후 0시간, 파란 선: 감염후 12시간, 붉은 선: 감염후 24시간) 측정 결과를 나타낸 것이다. (**P < 0.01, two-way ANOVA 후 Bonferroni's post test 수행). Means ± S.D., N = 3. (C) JC-1을 사용하여 미토콘드리아 막전위의 유세포 분석을 보여주는 그래프이다(**P < 0.01, Student's t-test). Means ± S.D., N = 3.

도 2는 대사적 분석을 통해 CVB3 매개 대사적 변화를 확인하는 그림이다. 구체적으로, (A)는 주요 성분 분석(Principal component analysis, PCA) 점수 플롯이고, (B)는 23개의 대사산물로 얻은 로딩 플롯이다. PC1에 속하는 대사산물들은 유사성에 따라서 분류했을 때, 과당(fructose), 류신(leucine), 이소류신(isoleucine), 발린(valine), 페닐알라닌(phenylalanine), 글루코스(glucose), 글리세롤(glycerol) 및 트레오닌(threonine)을 1개의 클러스터로 분류하였다(붉은 네모). 또한, PC2에 속하는 대사산물들을 유사성에 따라 분류했을 때, 아스파르트산(aspartic acid), 말산(malic acid), 인산(phosphoric acid), 푸마르산(fumaric acid), 베타 알라닌(β-alanine), 알라닌(alanine), 프롤린(proline) 및 글리신(glycine)을 다른 1개의 클러스터로 분류하였다(파란 네모).

도 3은 대사적 분석을 통해 CVB3 매개 대사적 변화를 확인하는 그림이다. (A)는 23개의 대사산물들의 상관관계 매트릭스를 나타낸 것이다. 각각의 네모박스에서 파란색 또는 붉은색의 세기(intensity)는 피어슨 상관관계 계수를 나타낸다. 파란색으로 나타나는 군은 6개의 아미노산(프롤린(proline), 알라닌(alanine), 글리신(glycine), 베타 알라닌(β아스파르트산(aspartic acid), 글루탐산(glutamic acid)) 및 3개의 유기산(인산(phosphoric acid), 말산(malic acid), 푸마르산(fumaric acid))을 포함하였다. 붉은 색으로 표시되는 다른 군은 7개의 아미노산(글루타민(glutamine), 세린(serine), 류신(leucine), 페닐알라닌(phenylalanine), 트레오닌(threonine), 발린(valine), 이소류신(isoleucine)), 3개의 유기산(젖산(lactic acid), 숙신산(succinic acid), 구연산(citric acid)), 2개의 당(과당(fructose), 글루코스(glucose)), 1개의 아민(에탄올아민(ethanolamine)), 1개의 당알코올(글리세롤(glycerol))을 포함하였다. (B)는 CVB3 감염후 가장 큰 변화를 가진 대사산물의 박스 플롯을 나타낸다(**P < 0.01, Student's t-test). Means ± S.D., N = 3.

도 4는 당분해과정 억제제가 CVB3 치료를 위한 새로운 전략임을 보여주는 그림이다. (A)는 글루코스(1 g/L)를 함유하거나 함유하지 않은 배지로 처리한 헬라 세포에서 CVB3 역가의 정량화한 그래프이다(**P < 0.01, Student's t-test). Means ± S.D., N = 3. (B)는 글루코스 농도를 배지에서 1 g/L로 고정시킨 후, 당분해과정 억제제, 2-디옥시-D-글루코스(2-Deoxy-d-glucose, 2-DG) 또는 옥살산나트륨(Sodium oxamate, SO)으로 처리한 헬라 세포에서 CVB3 역가의 정량화한 그래프이다(**P < 0.01, Student's t-test). Means ± S.D., N = 3.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0033] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결(접속, 접촉, 결합)"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0034] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0036] 본 발명의 일측면에 따르면, 콕사키바이러스(Coxsackievirus) B3의 감염 치료 또는 예방용 조성물은 당분해과정(glycolysis) 억제제를 포함한다. 상기 콕사키바이러스 B3는 숙주세포의 당분해과정 수준을 증폭시킬 수 있다. 즉, 콕사키바이러스 B3는 당분해과정 수준을 증가시킴으로써 숙주세포의 대사 과정의 변화를 야기시킬 수 있다. 상기 당분해과정 수준은 ECAR(extracellular acidification rate)를 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0037] 상기 당분해과정 수준은 당분해과정, 당분해 능력(glycolytic capacity) 또는 당분해 비축(glycolytic reserve)일 수 있다. 상기 당분해과정은 세포가 당분해과정을 위해 대사시키는 글루코스를 주입함으로써 측정될 수 있다. 상기 당분해 능력은 미토콘드리아 ATP 생산을 억제시키는 올리고마이신(oligomycin)을 주입함으로써 측정될 수 있으며, 상기 당분해 비축은 헥사키나제 II(hexokinase II)에 경쟁적 결합을 통해 당분해과정을 억제

시키는 2-디옥시-D-글루코스(2-Deoxy-d-glucose)를 주입함으로써 측정될 수 있다.

[0038] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 콕사키바이러스 B3는 12시간 및 24시간 모두에서 ECAR 값을 증가시켰고(도 1B), 이는 콕사키바이러스 B3 감염이 당분해과정, 당분해 능력 또는 당분해 비축을 포함하는 당분해과정 수준의 증가를 통해 대사과정 변화를 야기시킬 수 있다는 것을 의미한다.

[0039] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 콕사키바이러스 B3는 숙주세포의 미토콘드리아 막전위를 감소시킬 수 있다. 상기 미토콘드리아 막전위(Mitochondrial membrane potential, MMP)는 OXPHOS동안 ATP합성을 유도하는, 내부 미토콘드리아 막에 걸쳐서 나타나는 전기화학적 구배이다. 상기 콕사키바이러스 B3는 12시간 및 24시간 모두에서 숙주세포의 MMP를 감소시켰다(도 1C).

[0040] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 콕사키바이러스 B3의 감염은 숙주세포 내 2종 이상의 대사산물(metabolites)과 음의 상관관계를 가질 수 있다. 상기 음의 상관관계를 가지는 대사산물은 1종 이상의 아미노산 및 1종 이상의 유기산일 수 있으며, 구체적으로 상기 음의 상관관계를 가지는 아미노산은 프롤린(proline), 알라닌(alanine), 글리신(glycine), 베타 알라닌(β-alanine), 아스파르트산(aspartic acid) 및 글루탐산(glutamic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 바람직하게, 상기 아미노산은 6종일수 있고, 6종의 아미노산은 프롤린(proline), 알라닌(alanine), 글리신(glycine), 베타 알라닌(β-alanine), 아스파르트산(aspartic acid) 및 글루탐산(glutamic acid)일 수 있다. 상기 음의 상관관계를 가지는 유기산은 인산(phosphoric acid), 말산(malic acid) 및 푸마르산(fumaric acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 인산(phosphoric acid), 말산(malic acid) 및 푸마르산(fumaric acid)으로 이루어진 3종일 수 있다.

[0041] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 콕사키바이러스 B3의 감염은 숙주세포 내 5종 이상의 대사산물(metabolites)과 양의 상관관계를 가질 수 있다. 상기 양의 상관관계를 가지는 대사산물은 1종 이상의 아미노산, 1종 이상의 유기산, 1종 이상의 당, 1종의 아민 및 1종의 당알코올일 수 있다. 구체적으로, 상기 양의 상관관계를 가지는 아미노산은 글루타민(glutamine), 세린(serine), 류신(leucine), 페닐알라닌(phenylalanine), 트레오닌(threonine), 발린(valine) 및 이소류신(isoleucine)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 글루타민(glutamine), 세린(serine), 류신(leucine), 페닐알라닌(phenylalanine), 트레오닌(threonine), 발린(valine) 및 이소류신(isoleucine)으로 이루어진 7종일 수 있다. 상기 양의 상관관계를 가지는 유기산은 젖산(lactic acid), 숙신산(succinic acid) 및 구연산(citric acid) 으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 젖산(lactic acid), 숙신산(succinic acid) 및 구연산(citric acid) 으로 이루어진 3종일 수 있다. 상기 양의 상관관계를 가지는 당은 과당(fructose) 및 글루코스(glucose)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 과당(fructose) 및 글루코스(glucose)로 이루어진 2종일 수 있다. 상기 양의 상관관계를 가지는 아민은 에탄올아민(ethanolamine)일 수 있고, 상기 양의 상관관계를 가지는 당알코올은 글리세롤(glycerol)일 수 있다.

[0042] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 당분해과정 억제제는 2-디옥시-D-글루코스(2-Deoxy-d-glucose, 2-DG) 또는 옥살산나트륨(Sodium oxamate, SO)일 수 있다. 상기 2-디옥시-D-글루코스는 글루코스 아날로그이고, 글루코스 변환과정에서 초기 대사과정 단계를 촉매하는, 당분해과정 제1 속도제한 효소(the first rate-limiting enzyme)인 헥소키나제 II(hexokinase II)를 억제시킬 수 있다.

[0043] 상기 옥살산나트륨은 피루브산염(pyruvate)의 구조적 아날로그이고 혐기성 당분해과정에서 피루브산염 변환의 마지막 대사 단계를 촉매하는 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase)를 억제시킬 수 있다.

[0044] 본 발명에 따르면, 2-디옥시-D-글루코스는 옥살산나트륨보다 콕사키바이러스 B3 역가를 더욱 효과적으로 억제했다(도 4B). 하지만, 2-디옥시-D-글루코스는 반감기 등의 약동학적 특성이 안좋고 고농도로 주입해야하며 인플루엔자 바이러스 감염된 쥐의 죽음 초래하는 부작용을 보이므로, 이러한 점을 고려해볼 때, 바람직한 당분해과정 억제제는 옥살산나트륨일 수 있다.

[0046] 이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[0048] <u>실시예 1. 세포 배양 및 바이러스 감염</u>

[0049] Hela 세포들(CCL-2™ATCC, Manassas, Virginia, USA)은 5% CO_2를 포함하는 대기에서 10% 소태아혈청(16000036; Invitrogen Life Technologies) 및 100 μg/ml 페니실린/스트렙토마이신 칵테일(15240062; Invitrogen Life Technologies)이 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 11995065, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)에서 배양되었다. Hela 세포들은 콕사키바이러스 B3 (CVB3; 41202, National Culture Collection for Pathogens, Osong-eup, Korea)로 1시간동안 0.1의 MOI(multiplicity of infection)로 감염되었다. Mock 대조군으로서, Hela 세포들은 1시간동안 PBS(14190144; Invitrogen Life Technologies)로 처리되었다.

[0051] <u>실시예 2. 세포 사멸 시험(Apoptosis assay)</u>

[0052] 제조사의 매뉴얼에 따라 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (556547; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용해서 세포 사멸 시험을 수행했다.

[0054] <u>실시예 3. 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential; MMP) 측정</u>

[0055] MMP를 정량화하기 위해서, 세포들은 37 ° C에서 0.3 g/ml JC-1 (T3168; Invitrogen Life Technologies)로 30분 동안 처리되었고, 종래기술에 따라 유세포 분석을 위해 처리되었다.

[0056] 그 결과, 콕사키바이러스 B3의 감염이 12시간 및 24시간 모두에서 숙주세포의 MMP를 상당히 감소시켰다(도 1C).

[0058] <u>실시예 4. ECAR(extracellular acidification rate) 분석</u>

[0059] XFe24 flux analyzer 및 prep station (Seahorse Bioscience XFe24 Instrument; Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA)이 사용되었다. 요약하자면, 5×10^4의 세포들은 XFe24 세포 배양 플레이트(100850-001; Seahorse Bioscience)의 각 well에 놓았고, 종래기술에 따라 검사되었다.

[0060] 그 결과, 콕사키바이러스 B3의 감염이 12시간 및 24시간 모두에서 ECAR값을 상당히 증가시켰다(도 1B).

[0062] <u>실시예 5. 대사산물 추출 및 기체 크로마토그래피 질량분석(GC-MS)</u>

[0063] 세포로부터 나온 친수성 대사산물들은 종래기술처럼 약간 변형시킴으로써 추출되었다. 샘플은 자동샘플러 바이알로 옮겨졌고 기체 크로마토그래피 질량분석법(GC-MS, a GCMS-QP2010 Ultra system, Shimadzu, Kyoto, Japan)으로 분석되었다. GC-MS분석은 종래기술에 따라 수행되었다. 피어슨 상관관계(Pearson's correlation, PCA) 분석은 SAS 소프트웨어9.4 (SAS Institute, San Diego, CA, USA)를 사용해서 수행되었고 Multi-Experiment Viewer version 4.9.0 (MeV; https://webmev.tm4.org)을 사용하는 계층적 군집분석(Hierarchical Clustering Analysis; HCA)으로 시각화되었다.

[0064] 당분해과정 수준이 12시간이후부터 상당히 변화되는 것이 관측되었기 때문에 발명자들은 0시간 및 12시간 시점에서 대사산물들을 분석하였다. 피어슨 상관관계분석(PCA)은 0시간 및 12시간에 각각에 해당하는 군, 즉 총 2개 군들간의 잠재적 대사산물 차이를 시각화하기 위해 수행되었다. 그 결과, PCA는 2개의 가장 높은 순위의 주요 구성성분들(principal components, PC)이 PCA점수 플롯에서 전체 변수들 중에서 89.9%(PC1 48.8%; PC2, 41.9%)를 차지했다는 것을 보여주었다(도 2A). PC1 및 PC2 모두 0시간 및 12시간 군들로 분리되었고, 이는 상기 2개 군들간의 대사산물들 차이를 말해주고 있었다(도 2A). 게다가, PCA로딩 플롯은 상기 차이와 관련되어 있는 주요 요소들을 나타내고 있었고, 이는 13개의 아미노산, 6개의 유기산, 2개의 당, 1개의 아민 및 1개의 당알코올이었다(도 2A). PC1에 속하는 대사산물들을 유사성에 따라 분류했을 때, 과당(fructose), 류신(leucine), 이소류신(isoleucine), 발린(valine), 페닐알라닌(phenylalanine), 글루코스(glucose), 글리세롤(glycerol) 및 트레오닌(threonine)을 1개의 클러스터로 분류하였다(도 2A, 붉은 네모). 상기 클러스터는 당분해과정의 주요 연료인 글루코스 및 당분해과정의 중간산물인 과당-6-인산(fructose-6-phosphate)의 주요 원천인 과당(fructose)를 포함하였다(도 2B, 붉은 점). 또한, PC2에 속하는 대사산물들을 유사성에 따라 분류했을 때, 아스파르트산(aspartic acid), 말산(malic acid), 인산(phosphoric acid), 푸마르산(fumaric acid), 베타 알라닌(β-alanine), 알라닌(alanine), 프롤린(proline) 및 글리신(glycine)을 다른 1개의 클러스터로 분류하였다(도 2B,

파란 네모).

[0065] PCA결과값은 계층적 군집분석(HCA)로 이전시켜서 양의 상관관계는 붉은 색으로, 음의 상관관계는 파란색으로 시각화되었다. 파란색으로 표시되는 군은 6개의 아미노산(프롤린(proline), 알라닌(alanine), 글리신(glycine), 베타 알라닌(β아스파르트산(aspartic acid), 글루탐산(glutamic acid)) 및 3개의 유기산(인산(phosphoric acid), 말산(malic acid), 푸마르산(fumaric acid))을 포함하였다(도 3A). 붉은 색으로 표시되는 다른 군은 7개의 아미노산(글루타민(glutamine), 세린(serine), 류신(leucine), 페닐알라닌(phenylalanine), 트레오닌(threonine), 발린(valine), 이소류신(isoleucine)), 3개의 유기산(젖산(lactic acid), 숙신산(succinic acid), 구연산(citric acid)), 2개의 당(과당(fructose), 글루코스(glucose)), 1개의 아민(에탄올아민(ethanolamine)), 1개의 당알코올(글리세롤(glycerol))을 포함하였다(도 3A). 붉은색으로 표시된 군에서, 2개의 당(과당(fructose), 글루코스(glucose))는 가장 양의 상관관계가 높았다(도 3A; $r = 0.9425$, $P < 0.01$). 2개의 구성요소 중에서, 과당은 콕사키바이러스 B3 감염이후 가장 큰 변화를 가진 대사산물이었다(도 3B; $P < 0.01$). 이런한 결과는 콕사키바이러스 B3가 당분해과정 의존성 증가를 통해 대산과정 변화를 야기했다는 것을 보여준다.

[0067] <u>실시예 6. 플라크 분석(Plaque assay)</u>

[0068] 세포 상층액의 바이러스 역가는 종래기술에 따라 결정되었다. 요약하자면, CVB3감염된 세포들로부터 나온 상층액은 90-95% confluence로 Vero 세포 단층위에 덮어씌우기 전에 10배 연속 희석되었다 Vero 세포들은 1시간의 인큐베이션 이후에 PBS로 린스되었고, 2 × DMEM (LM 20150; Welgene, Gyeongsan, Korea) / 2% agar (50100; Lonza, Walkersville, MD, USA) mixture로 덮어씌워졌다. 세포들은 3.75% 포름알데하이드 (F8775; Sigma-Aldrich) 용액으로 고정되었고 37 °C에서 72시간동안 배양된 후에 1% crystal violet (V5265; Sigma-Aldrich)으로 염색되었다. 바이러스 역가는 플라크를 집계한 뒤에 밀리리터 당 플라크 형성 단위(PFU)로 결정되었다.

[0070] <u>실시예 7. 당분해과정 억제제 적용</u>

[0071] Hela 세포들(CCL-2™ATCC, Manassas, Virginia, USA)은 5% CO_2를 포함하는 대기에서 10% 소태아혈청(16000036; Invitrogen Life Technologies) 및 100 μg/ml 페니실린/스트렙토마이신 칵테일(15240062; Invitrogen Life Technologies)이 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 11995065, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)에서 배양되었다. Hela 세포들은 콕사키바이러스 B3 (CVB3; 41202, National Culture Collection for Pathogens, Osong-eup, Korea)로 1시간동안 0.1의 MOI(multiplicity of infection)로 감염되었다. Mock 대조군으로서, Hela 세포들은 1시간동안 PBS(14190144; Invitrogen Life Technologies)로 처리되었다. CVB3 감염에 따른 글루코스 효과를 조사하기 위해서, Hela 세포들은 다른 농도들의 글루코스(A2494001; Invitrogen Life Technologies; 0 g/L, 1 g/L)를 첨가한 뒤에 글루코스가 없는DMEM (11966025, Invitrogen Life Technologies)으로 처리되었다. 그리고, 배지에서 글루코스 농도를 1 g/L로 고정시킨 후에, Hela 세포들은 CVB3 감염에 따른 당분해과정 억제 효과를 연구하기 위해 10 mM 2-deoxy-D-glucose(2-DG; D8375; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 또는 10 mM sodium oxamate (SO; O2751; Sigma-Aldrich)로 처리되었다.

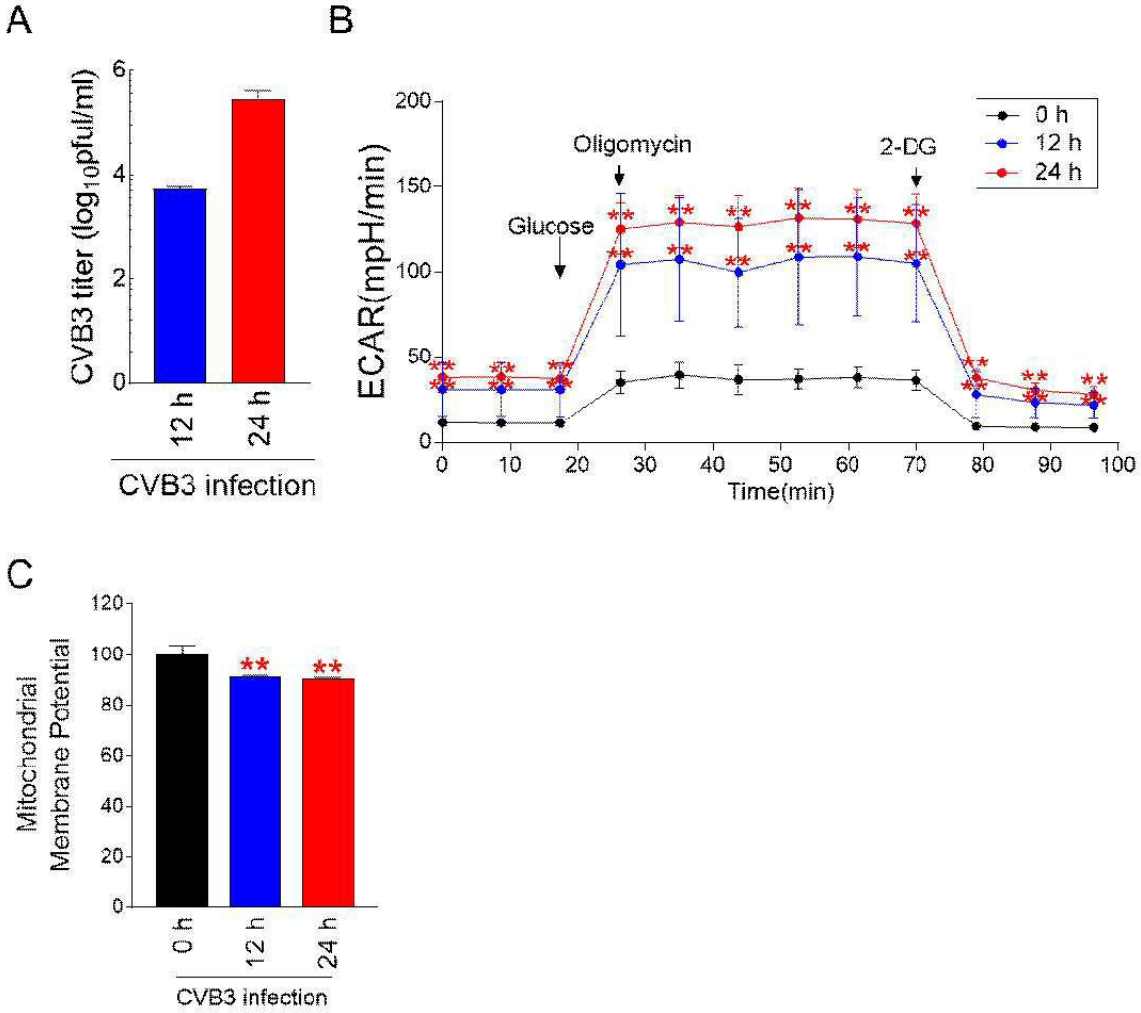
[0072] 서로 다른 글루코스 농도로 세포들을 처리하거나 당분해과정 억제제로 처리함으로써 콕사키바이러스 B3 감염이 글루코스에 미치는 영향을 확인하였다. 먼저, 세포들은 글루코스(1 g/L)가 존재하는 배지 또는 존재하지 않는 배지로 처리되었다. 그런 다음, 콕사키바이러스 B3 감염 후 72시간뒤에 콕사키바이러스 B3 역가(titers)가 조사되었다. 콕사키바이러스 B3 역가는 글루코스가 없었을 때보다 글루코스가 있었을 때가 10배 더 높았다. 이는 글루코스가 콕사키바이러스 B3의 숙주세포내 복제하기 용이한 환경을 제공했다는 것을 의미한다(도 4A). 배지의 글루코스 농도를 1 g/L로 고정시킨 후에, 세포들은 추가적으로 당분해과정 억제제인 2-디옥시-D-글루코스(2-Deoxy-d-glucose, 2-DG) 또는 옥살산나트륨(Sodium oxamate, SO)으로 처리되었다. 2-DG 또는 SO에 의한 당분해과정 억제는 대조군과 비교해서 콕사키바이러스 B3 역가를 상당히 감소시켰고, 이는 당분해과정 억제제를 활용하는 전략이 콕사키바이러스 B3 치료에 유용함을 의미한다(도 4A).

[0074] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

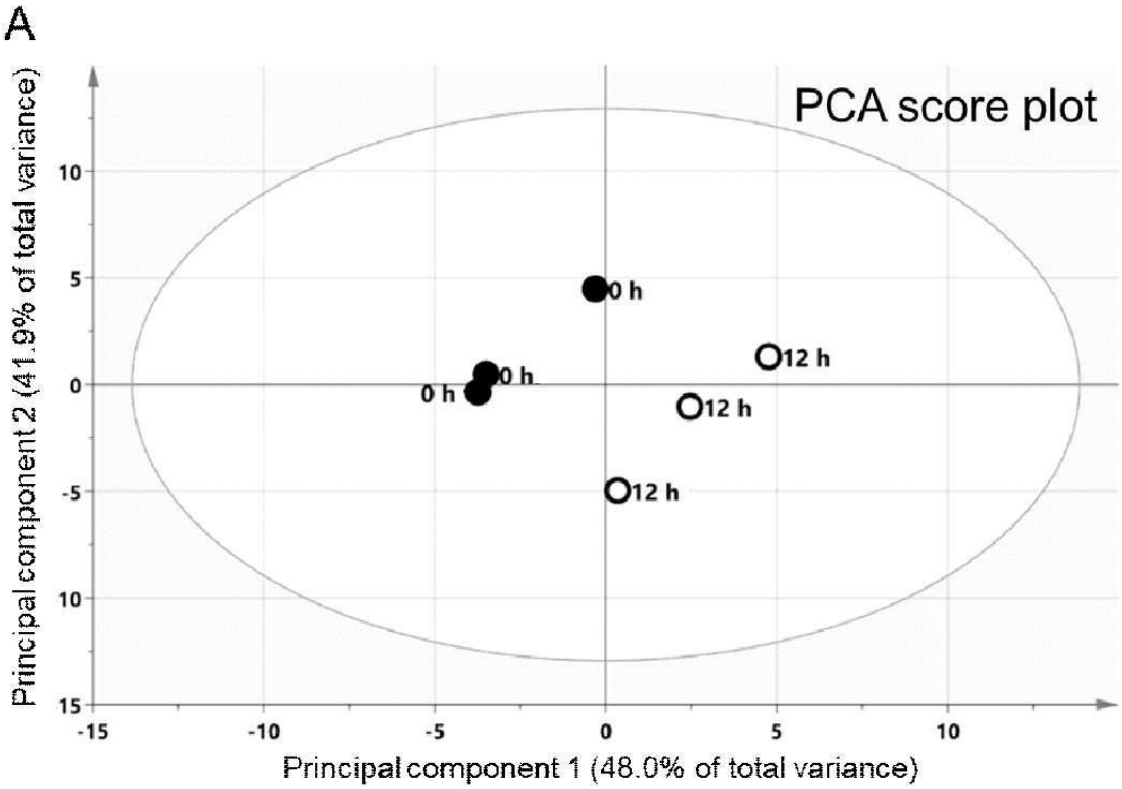
[0075] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

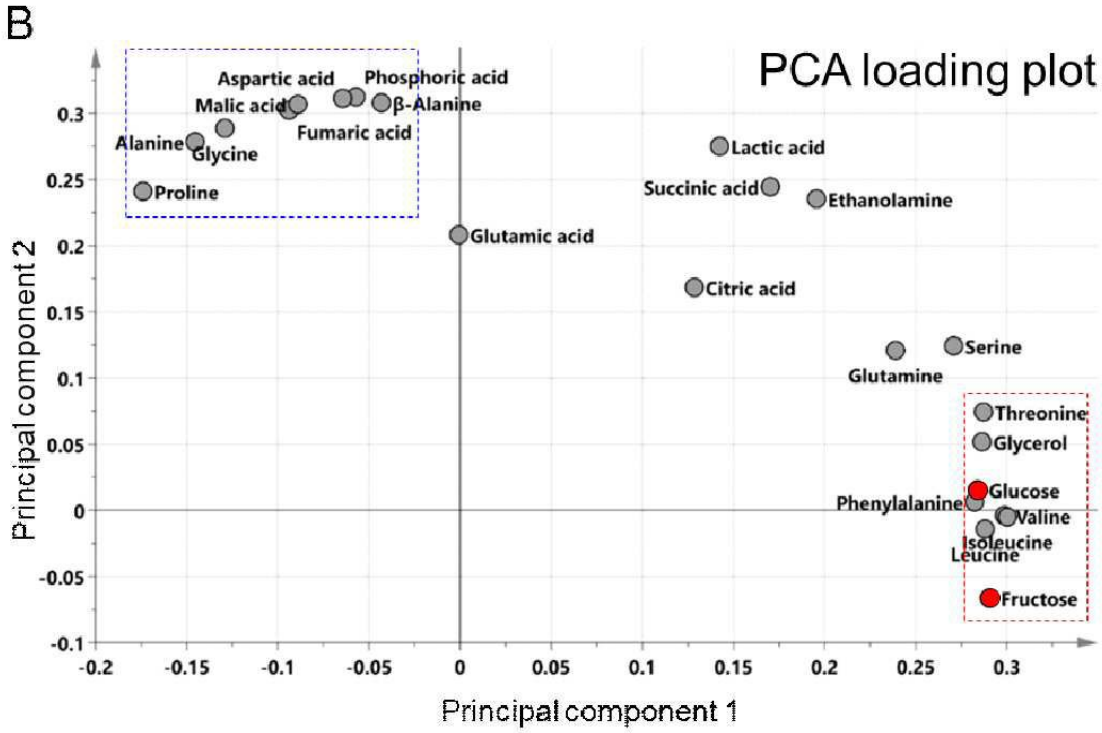
도면

도면1

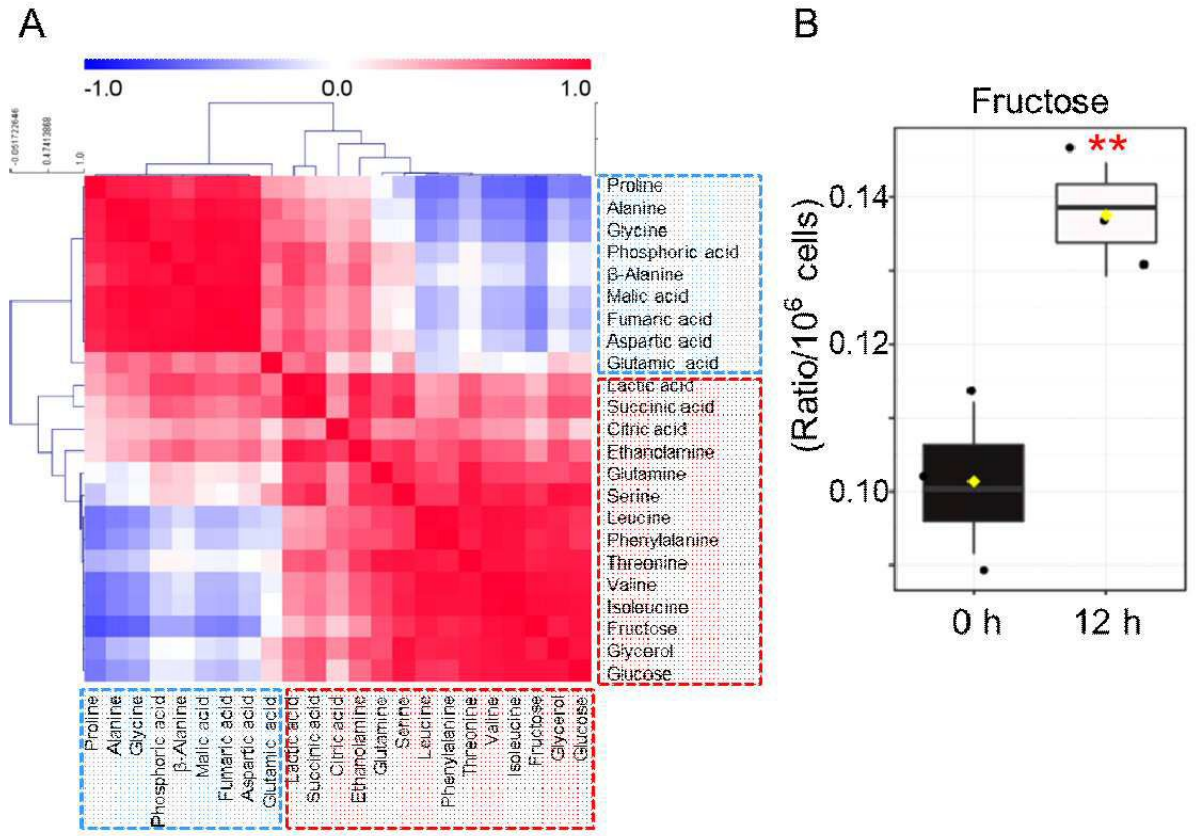


도면2

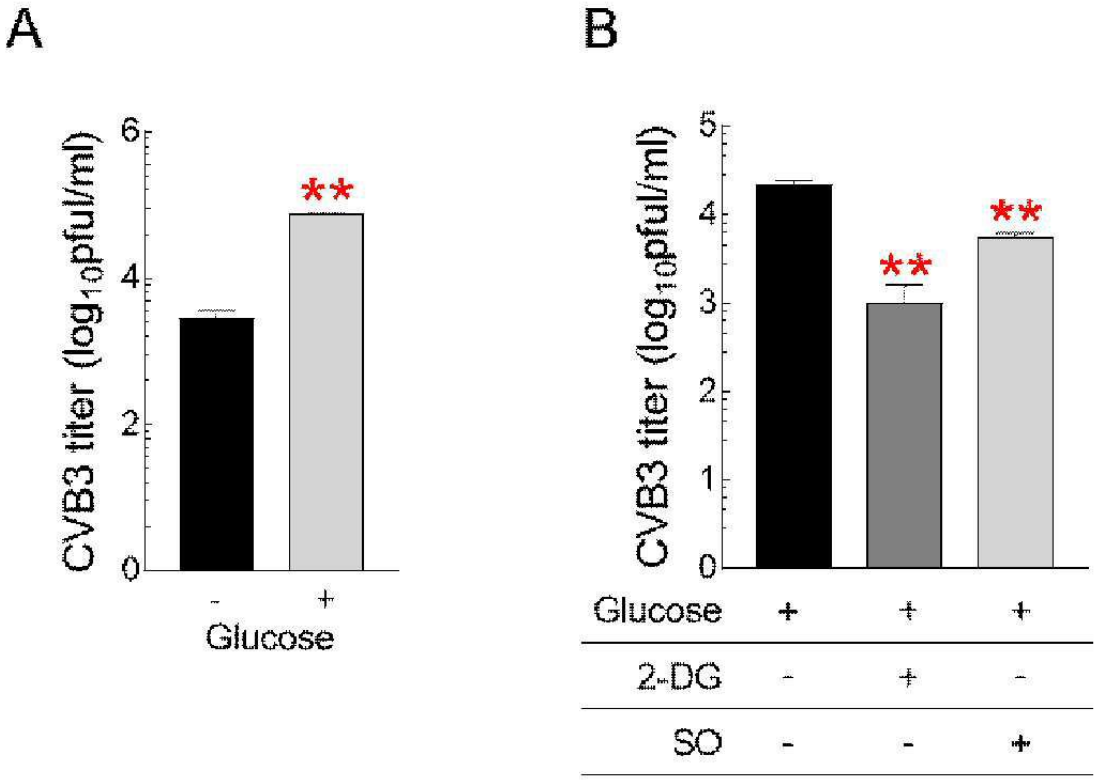

A
PCA score plot
0 h
0 h
0 h
12 h
12 h
12 h
Principal component 2 (41.9% of total variance)
Principal component 1 (48.0% of total variance)
10
5
0
-5
10
15
-15
-10
-5
0
5
10


B
PCA loading plot
Aspartic acid
Phosphoric acid
Malic acid
β-Alanine
Fumaric acid
Alanine
Glycine
Proline
Lactic acid
Succinic acid
Ethanolamine
Glutamic acid
Citric acid
Serine
Glutamine
Threonine
Glycerol
Glucose
Phenylalanine
Valine
Isoleucine
Leucine
Fructose
Principal component 2
Principal component 1
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
-0.05
-0.1
-0.2
-0.15
-0.1
-0.05
0
0.05
0.1
0.15
0.2
0.25
0.3

도면3


A
-1.0
0.0
1.0
Proline
Alanine
Glycine
Phosphoric acid
β-Alanine
Malic acid
Fumaric acid
Aspartic acid
Glutamic acid
Lactic acid
Succinic acid
Citric acid
Ethanolamine
Glutamine
Serine
Leucine
Phenylalanine
Threonine
Valine
Isoleucine
Fructose
Glycerol
Glucose
B
Fructose
**
(Ratio/10^6 cells)
0.14
0.12
0.10
0 h
12 h

도면4


A
CVB3 titer (log10pfu/ml)
6
4
2
0
**
-
+
Glucose
B
CVB3 titer (log10pfu/ml)
5
4
3
2
1
0
**
**
Glucose + + +
2-DG - + -
SO - - +